

(19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 9/127

(45) 공고일자 2005년09월16일
(11) 등록번호 10-0515249
(24) 등록일자 2005년09월08일

(21) 출원번호	10-1999-7007539	(65) 공개번호	10-2000-0075480
(22) 출원일자	1999년08월19일	(43) 공개일자	2000년12월15일
번역문 제출일자	1999년08월19일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP1998/000816	(87) 국제공개번호	WO 1998/36735
국제출원일자	1998년02월12일	국제공개일자	1998년08월27일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 북한, 대한민국, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 리투아니아, 라트비아, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 루마니아, 싱가포르, 기니 비사우, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 MI97A00363 1997년02월20일 이탈리아(IT)

(73) 특허권자 아지엔드 키미쉐 리유나이트 안젤리니 프란체스코 에이.씨.알.에이.에프. 에스.피.에이
이탈리아 아이-00181 로마 70 비알레 아멜리아

(72) 발명자 카발로지오 반니
이탈리아아이-00122오스티아45비아델레타르탄

마르치토레오나르도
이탈리아아이-63012쿠프라마리타마2비아에스.마르게리타

(74) 대리인 윤동열
이선희

심사관 : 유준석

(54) 고 수불용성의 활성 성분을 함유한 수용성 약학적 조성물

요약

본 발명은 고 수불용성(highly insoluble in Water)으로 리포솜(liposome)에 분산되는 활성 성분을 함유하고 있는 수용성 약학적 조성물, 및 이의 제제 방법을 제공한다.

색인어

수용성 약학적 조성물, 고 수불용성, 활성 성분, 리포솜, 인지질

명세서

기술분야

본 발명은 고 수불용성의 활성 성분을 함유한 수용성 약학적 조성물에 관한 것으로, 특히 본 발명은 활성 성분이 리포솜(liposome)에 분산되는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

약학계에서는 신규한 리포솜 제제(preparations)를 발견하기 위해서 수많은 연구가 수행되고 있다. 그러나, 고 수불용성의 활성 성분과 특히 연관되어 많은 문제점들이 있다. 특히, 활성 성분의 수용해도는 0.01%(w/v) 이하이다.

사실, 수용해도가 낮은 활성 성분을 함유한 리포솜을 제조하는데 통상적으로 사용되는 기술은 하기와 같은 단계를 포함하고 있다;

- (a) 활성 성분과 미리선택된 인지질(phospholipid)을 적당한 유기 용매, 예를 들어 클로로포름에서 용해시키는 단계;
- (b) 상기 용매를 감압에서 증발시켜, 활성 성분/인지질막(phospholipid film)을 얻는 단계;
- (c) 제 2 유기 용매, 예를 들어 터뷰틸알콜을 추가하는 단계;
- (d) 상기에서 얻은 용액을 액화 질소의 온도에서 동결시키는 단계;
- (e) 상기 동결액을 동결건조(lyophilisation)시키는 단계;
- (f) 상기 동결건조액과 완충액을 수화시켜, 멀티라멜라(multilamellar) 리포솜(MLV)의 현탁액을 제공하는 단계; 및
- (g) 상기 현탁액을 초음파로 처리하여, 작은 리포솜(smaller liposome:SUV)의 현탁액을 제공하는 단계.

이 방법의 실시예는 A. Sharma et al.의 "Pharmaceutical Research"(2(6), 889-896(1994))에 기술되어 있다.

그러나, 이 기술에는 큰 어려움이 있고, 리포솜에 유기 용매가 미량 존재한다는 문제점이 있다.

그러나, 상기 저자들은 연구조사된 건조 지질막의 수화(핸드 셰이킹(hand shaking)), 동결해동 등의 MLV 리포솜의 제제에 대한 다양한 기술과, 압출(extrusion), 초음파 처리 등으로 리포솜의 크기를 축소시키는(MLV→SUV) (후공정) 다양한 기술을 참조하고 있으며, 상술한 단계 (a)~(g)를 포함하고 있는 상기에서 상세하게 기술한 방법이 최적(*loc. cit.* page 890, right column, lines 51-57)이라는 결론을 내렸다. 그러나, 상기 저자들은 MLV 리포솜의 제제에 관한 상기 첫 번째 기술과 리포솜의 크기를 축소시킬 수 있는 상기 두 번째 기술을 서로 결합시키는 방법에 대해서는 언급하지 않았다.

WO-A-96 40064, EP-A-0 578 629, DE-A-4 038 075 및 DE-A-4 430 593는 수불용성의 활성 성분이 리포솜에서 분산되는 약학적 조성물을 개시하고 있다. 이러한 활성 성분은 각 시클로스포린(cyclosporin)-A, 멜라토닌(melatonin) 및 탁솔(taxol)이다.

그러나, 상술한 참조문헌들 중의 어떠한 문헌도 동결 및 해동기술을 압출과 결합시키는 수용성 리포솜 조성물의 제조 방법에 대해서는 기술하지 않고 있다.

놀랍게도, 최근에 압출과 결합된 동결 및 해동 기술로 수용해도가 0.01%(w/v) 이하인 활성 성분의 수용성 리포솜 조성물을 어떠한 유기 용매를 사용하지 않고도 제조할 수 있다는 것을 발견하였다.

발명의 상세한 설명

상기 기술 및 하기에서 기술될 특허청구범위에서, 수용해도가 0.01%(w/v) 이하인 활성 성분을 "고 수불용성(highly insoluble in water)"으로 정의한다.

그러므로, 본 발명의 첫 번째 목적은 하술할 청구항 1에 따른 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

고 수불용성의 활성 성분의 전형적인 예는 하기와 같다: 로니다민(lonidamine) (용해도: 3×10^{-6} g/ml), 멜라토닌(melatonin) ["practically insoluble", G.S. Shida et al. "J. Pineal Res.", 16, 198-201, (1994)], 시클로스포린-A(cyclosporin-A) ["insoluble in water", monograph on cyclosporin-A in "Analytical Profiles of Drug Substances", 16, 163, (1987)], 및 빈다리트(bindarit) (용해도: 1×10^{-4} g/ml).

본 발명에 따른 리포솜 조성물은 포스포글리세리드(phosphoglycerides), 글리세리드, 디글리세리드, 트리글리세리드, 인지질, 갈락토실(galactosyl)과 글루코실 지질(glucosyl lipids), 콜레스테롤과 그 유도체, 스핀고리피드(sphingolipids)와 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 성분으로 구성되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 조성물을 인지질로 구성하는 것이다.

본 발명에 따른 리포솜 조성물의 전형적인 예는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine), N-아실(acyl)-포스파티딜콜린, 포스파티딜 에탄올아민(ethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 스핀고미엘린(sphingomyelin), 무극(non-polar) 지질, 트리글리세리드, 유리 지방산(free fatty acids), DL- α -토코페롤을 함유한다.

본 발명에 따른 바람직한 리포솜 조성물은 하기와 같은 성분을 함유하고 있다.

성분 %(w/w)

포스파티딜콜린 : 85-97

리조포스파티딜콜린 : 0-5

N-아실-에탄올아민 : 0-4

포스파티딜 에탄올아민 : 0-10

트리글리세리드 : 0-4

유리 지방산 : 0-3

DL- α -토코페롤 : 0-1

본 발명에 따른 특히 바람직한 리포솜 조성물은 하기와 같은 성분을 함유하고 있다.

성분 %(w/w)

포스파티딜콜린 : 94

리조포스파티딜콜린 : 3

N-아실-에탄올아민 : 1

포스파티딜 에탄올아민 : 0.1

트리글리세리드 : 1

유리 지방산 : 0.75

DL- α -토코페롤 : 0.15

일반적으로, 본 발명에 따른 리포솜의 크기는 500nm 미만이다. 바람직한 리포솜의 크기는 50-250nm의 범위이다.

본 발명의 두 번째 목적은 하술할 청구항 6에 따른 수용성 약학적 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다. 즉, 본 발명은 수용해도가 0.01%(w/v) 이하이고, 리포솜에서 분산되는 활성 성분을 함유하고 있는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것으로서,

- (a) 상기 활성 성분을 지질에서 20-30℃의 온도로 하여 분산시키는 단계;
 - (b) 상기 분산액을 수상(aqueous phase)에 현탁시키는 단계;
 - (c) 상기 현탁액을 주위 온도에서 0-48 시간 동안 방치하는 단계;
 - (d) 30-75℃의 온도에서 10-40분간 가열하는 단계;
 - (e) -150/-200℃의 온도에서 동결하는 단계;
 - (f) 상기 (d)와 (e)의 단계를 적어도 2회 이상, 8회 이하로 반복하는 단계;
 - (g) 직경 500-1000nm의 구멍을 갖은 여과막(filtering menbrane)을 통해 여과하는 단계;
 - (h) 직경 50-400nm의 구멍을 갖은 막을 통해 압출하는 단계; 및
 - (i) 트랩(trap)되지 않은 모든 활성 성분을 제거하는 단계;
- 를 포함한다.

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

삭제

단계 (c)의 기간은 리포솜에서 트랩되는 고 수불용성의 활성 성분의 양에 의존한다. 그러나, 당업계에 대해 통상의 지식을 가진 사람이라면, 몇 가지 간단한 일상적인 실험으로 활성 성분과 리포솜 조성물의 각 형태에서 정확한 기간을 결정할 수 있으므로, 기간 결정에 대해서는 어떠한 어려움도 없을 것이다.

수상은 바람직하게 0.05%-0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액으로 구성되어야 한다.

일반적으로, 사용된 지질의 양은 수용액의 각 중량부에 대해서 0.01-0.4중량부이다. 다시 말해, 활성 성분의 양은 일반적으로 지질의 각 중량부에 대해서 0.01-0.3중량부이다.

일반적으로, 분산제는 UltraturraxTM 타입(type)의 호모게나이저(homogeniser)이다.

일반적으로, 압출 단계는 압출 가스로서, 질소, 헬륨 및 아르곤으로 이루어진 군으로부터 선택된 압축 가스 또는 불활성 가스를 사용하여 시행된다. 바람직한 불활성 가스는 헬륨이다. 이 압출 단계에서, 압력은 바람직하게 500-5500kPa 이어야 하고, 온도는 바람직하게 20-75℃ 이어야 하며, 보다 바람직하게는 40-65℃ 이다. 적당한 압출기의 일반적인 예는 Lipex Biomembranes Thermobarrel 타입, 또는 구멍(pores)의 크기가 50-600nm인 폴리카보네이트(polycarbonate) CostarTM 막(membranes)을 가진 필터(filter)를 구비한 Emulsiflex CC Avestin 타입이 있다.

일반적으로, 단계 (h)는 적어도 2회 이상, 8회 이하로 반복된다. 바람직하게는 6회이다.

실시에

이하 실시예들을 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 기술한다. 그러나, 본 발명이 이들 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

100mg의 멜라토닌을 인지질 1g에 UltraturraxTM 타입의 호모게나이저를 사용하여 10분간 30℃의 온도에서 분산시켰다. 그 직후, 이 분산액을 0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액 10ml에서 상기 호모게나이저를 사용하여 현탁(suspend)시켰고, 그 다음에 55℃의 물중탕으로 20분간 가열하였다.

이 방법으로 얻어진 현탁액(suspension)에 냉각 및 가열의 하기의 순환 공정을 시행하였다;

- 액화 질소를 1분간 냉각,
- 인지질이 완벽하게 유동화될 때까지 55℃의 온도에서 가열.

이 순환 공정을 6회 반복하였다.

이 현탁액을 Lipex Biomembrane 장치를 사용하여 0.6μm의 필터를 통해 2번 통과시켰다.

따라서, 0.1μm의 폴리카보네이트 CostarTM 필터를 가진 Lipex Biomembranes Extruder Thermobarrel 타입의 10ml 압출기를 사용하여, 55℃의 온도에서, 압출 가스로서 헬륨 가스를 사용하고, 압력은 1000-4800kPa의 조건에서 6회의 연속적인 압출 순환 공정을 거쳐서, "멀티라멜라 라아지 베시클(Multilamellar Large Vesicles)"(MLV) 현탁액을 얻었다.

상술한 바와 같은 작동을 위해 제조품의 3가지 배치(batch) (LM/186, LM/188 및 LM/190)를 준비하였다.

하기 시험은 배치를 통해 시행되었다;

* 수용성 리포솜 조성물에서 멜라토닌의 양(HPLC 분석);

* 리포솜 크기;

* 리포솜에서 트랩된 멜라토닌의 양.

하기에서는 측정된 변수들과 이 변수들의 중요성(significance)을 설명한다.

변수(parameters) 중요성

① 리포솜 크기 - 재형 시간에서의 안정성

- 소포의 "용해"의 측정

② 멜라토닌의 양 - 수용성 리포솜 조성물에서 멜라토닌의 농도

- 재형 시간에서의 안정성

하기 표 1에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현되는 수용성 리포솜 제형(formulation)에서 얻어진 멜라토닌의 농도는 $8.05 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$ 이었고,

- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 93nm 이었고,

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 $80.5 \mu\text{g/mg}$ 이었고,

- 제형(formulation)에서 리포솜 응집(aggregation) 현상은 보이지 않았다.

하기 표 1에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 사용된 약품의 μg 을 나타낸다.

표 1.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
LM/186	7.8	85	78
LM/188	8.46	97	84.6
LM/190	7.9	98	79

HPLC 분석을 위해 하기 과정을 사용하였다;

- 고정 단계: 역상(inverse phase) PKB-100(250×4.6mm; 5 μm 스펠코 (Supelco))에서 칼럼(column);

- 이동 단계: 물 : 아세토니트릴(acetonitrile) = 80 : 20(v/v);

- 검출: UV 254nm.

리포솜의 평균 크기를 분석하는데에 하기의 두 가지의 장치를 사용한다;

(1) DELSA 440 Coulter,

(2) NICOMP Submicron particle sizer model 370.

하기와 같은 과정을 시행하였다;

(a) 상기 장치 (1)를 사용하여 시험하기 위해서, 1ml의 리포솜 현탁액을 0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액 10ml로 희석하였고,

(b) 상기 장치 (2)를 사용하여 시험하기 위해서, 0.5ml의 상기 용액 (a)를 0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액 10ml로 희석하였다.

실시예 2

상기 실시예 1에 사용된 1g의 인지질과 100mg의 멜라토닌 대신에 2g의 인지질과 50mg의 로니다민을 사용하여, 상술한 실시예 1과 동일한 공정을 시행하였다.

제조품의 3가지 배치(LM/195, GN/1L 및 GN/2L)를 준비한다.

하기 표 2에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 수용성 조성물에서 로니다민의 농도는 초기 용해도 $3 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ 로부터 3개의 배치에 대한 평균치 $3.83 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 로 이동되었고,

- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 79.6nm 이었고,

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 $19.2 \mu\text{g/mg}$ 이었고,

- 제형에서 리포솜 응집 현상이 보이지 않았다.

하기 표 2에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 약품의 μg 을 나타낸다.

표 2.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
LM/195	3.66	103	18.3
GN/1L	3.31	53	16.5
GN/2L	4.54	76	22.7

실시예 3

상기 실시예 1에 사용된 1g의 인지질과 100mg의 멜라토닌 대신에 2g의 인지질과 200mg의 멜라토닌을 사용하여, 상술한 실시예 1과 동일한 공정을 시행하였다.

따라서, 제조품의 3가지 배치(GN/1M, GN/2M 및 GN/3M)를 준비하였다.

하기 표 3에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 수용성 리포솜 제형에서의 펄라토닌의 농도는 $13.5 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 이었고,
- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 92.6nm 이었고,
- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 67.6 $\mu\text{g/mg}$ 이었고,
- 제형에서 리포솜 응집 현상이 보이지 않았다.

하기 표 3에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 사용된 약품의 μg 을 나타낸다.

표 3.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g/mg}$)*
GN/1M	10.66	104	53.3
GN/2M	13.90	76	69.5
GN/3M	16.03	98	80.15

실시예 4

0.1 μm 보다 큰 0.2 μm 의 폴리카보네이트막(polycarbonate membrane)을 통해 압출이 시행된다는 것을 제외하고는, 상술한 실시예 2와 동일한 공정을 시행하였다.

따라서, 제조품의 3가지 배치(GN/3L, GN/4L 및 GN/5L)를 준비하였다.

로니다민을 20mg에서 50mg으로, 인지질의 양을 1g에서 2g으로 증가시키고, 0.1 μm 의 막 대신에 0.2 μm 의 막으로 압출시킴으로써 얻어지는 데이터를 하기 표 4에 나타내었으며, 이는 수용성 조성물에서 로니다민의 농도의 증가의 유효량은 상기 실시예 2에서 얻어진다는 것을 보여준다. 사실, 로니다민의 농도의 평균치는 $4.47 \times 10^{-3} \text{g/ml}$ 이었다.

하기 표 4에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 약품의 μg 을 나타낸다.

표 4.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g/mg}$)*
GN/3L	4.23	134	21.15
GN/4L	4.44	129	22.20
GN/5L	4.75	109	23.75

실시예 5

20mg의 시클로스포린-A를 인지질 1g에 Ultraturax™ 타입의 호모게나이저를 사용하여 10분간 30℃의 온도에서 분산시켰다. 그 직후, 이 분산액을 0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액에서 상기 호모게나이저를 사용하여 현탁시켰고, 그 다음에 65℃의 물중탕으로 20분간 가열하였다.

이 방법으로 얻어진 현탁액에 냉각 및 가열의 하기 순환 공정을 시행하였다;

- 액화 질소에서 1분간 냉각,
- 인지질이 완벽하게 유동화될 때까지 65℃의 온도에서 가열.

이 순환 공정을 6회 반복하였다.

이 현탁액을 Lipex Biomembrane 장치를 사용하여 0.6 μ m의 필터를 통해 2번 통과시켰다.

따라서, 0.1 μ m의 폴리카보네이트 CostarTM 필터를 가진 Lipex Biomembranes Extruder Thermobarrel 타입의 10ml 압출기를 사용하여, 65℃의 온도에서, 압출 가스로서 헬륨 가스를 사용하고, 압력은 1000-4800kPa의 조건에서 6회의 연속적인 압출 순환 공정을 거쳐서, "멀티라멜라 라아지 베시클"(MLV) 현탁액을 얻었다.

따라서, 제조품의 3가지 배치(LM/416A, LM/416B 및 LM/416C)를 준비하였다.

하기 표 5에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현되는 수용성 리포솜 제형에서 얻어진 시클로스포린-A의 농도는 0.96×10^{-3} g/ml 이었고,

- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 103nm 이었고,

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 9.6 μ g/mg 이었고,

- 제형에서 리포솜 응집 현상이 보이지 않았다.

하기 표 5에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 약품의 μ g을 나타낸다.

표 5.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 (μ g/mg)*
LM/416A	0.96	103	9.6
LM/416B	0.94	99	9.4
LM/416C	0.98	107	9.8

실시예 6

상기 실시예 1에 사용된 1g의 인지질과 100mg의 멜라토닌 대신에 2g의 인지질과 50mg의 빈다리트를 사용하여, 상술한 실시예 1과 동일한 공정을 시행하였다.

따라서, 제조품의 3가지 배치(LM/356, LM/357 및 LM/358)를 준비하였다.

하기 표 6에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 수용성 리포솜 조성물에서 빈다리트의 농도는 초기 용해도 1×10^{-4} g/ml로부터 3개의 배치에 대한 평균치 4mg/ml로 이동하였고,

- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 108.3nm 이었고,

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 20.2 μ g/mg 이었고,

- 제형에서 리포솜 응집 현상이 보이지 않았다.

하기 표 6에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 약품의 μ g을 나타낸다.

표 6.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
LM/356	4.1	109.4	20.5
LM/357	4	109.7	20
LM/358	4	106	20

실시예 7

30mg의 시클로스포린-A를 인지질 2g에 UltraturraxTM 타입의 호모게나이저를 사용하여 10분간 30℃의 온도에서 분산시켰다. 그 직후, 이 분산액을 0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액에서 상기 호모게나이저를 사용하여 현탁하고나서, 주위 온도에서 24시간 방치하였다. 그 다음에 65℃의 물중탕으로 20분간 가열하였다.

이 방법으로 얻어진 현탁액을 냉각 및 가열의 하기 순환 공정을 시행하였다;

- 액화 질소에서 1분간 냉각,
- 인지질이 완벽하게 유동화될 때까지 65℃의 온도에서 가열.

이 순환 공정을 6회 반복하였다.

이 현탁액을 Lipex Biomembrane 장치를 사용하여 0.6 μm 의 필터를 통해 2번 통과시켰다.

따라서, 0.1 μm 의 폴리카보네이트 CostarTM 필터를 가진 Lipex Biomembranes Extruder Thermobarrel 타입의 10ml 압출기를 사용하여, 65℃의 온도에서, 압출 가스로서 헬륨 가스를 사용하고, 압력은 1000-4800kPa의 조건에서 6회의 연속적인 압출 순환 공정을 거쳐서, "멀티라멜라 라아지 베시클"(MLV) 현탁액을 얻었다.

따라서, 제조품의 3가지 배치(LM/422a, LM/422b 및 LM/422c)를 준비하였다.

하기 표 7에 주어진 데이터를 토대로 하기와 같은 결과를 얻었다;

- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현되는 수용성 리포솜 제형에서 얻어진 시클로스포린-A의 농도는 3mg/ml 이었고,
- 3개의 배치에 대한 리포솜의 평균 크기는 119.5nm 이었고,
- 3개의 배치에 대한 평균치로서 표현된 트랩된 양은 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이었고,
- 제형에서 리포솜 응집 현상이 보이지 않았다.

하기 표 7에서 (*)는 사용된 인지질의 mg 당 약품의 μg 을 나타낸다.

표 7.

배치	HPLC 양 (mg/ml)	평균 크기 (nm)	트랩된 양 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*
LM/422a	3.2	121.5	16
LM/422b	3	117.9	15
LM/422c	2.8	119	14

산업상 이용 가능성

이제까지 상술한 바와 같이, 본 발명은 수용해도가 0.01%(w/v) 이하의 고 수불용성으로 리포솜에 분산되는 활성 성분을 함유하고 있는 수용성 약학적 조성물을 어떠한 유기 용매를 사용하지 않고도, 제조할 수 있는 이점이 있는 발명이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

수용해도가 0.01%(w/v) 이하이고 리포솜에서 분산되는 활성 성분을 함유하고 있는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법으로서,

상기 제조 방법은 하기와 같은 단계를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법;

(a) 상기 활성 성분을 지질에서 20-30℃의 온도로 하여 분산시키는 단계;

(b) 상기 분산액을 수상(aqueous phase)에 현탁시키는 단계;

(c) 상기 현탁액을 주위 온도에서 0-48 시간 동안 방치하는 단계;

(d) 30-75℃의 온도에서 10-40분간 가열하는 단계;

(e) -150/-200℃의 온도에서 동결하는 단계;

(f) 상기 (d)와 (e)의 단계를 적어도 2회 이상, 8회 이하로 반복하는 단계;

(g) 직경 500-1000nm의 구멍을 갖은 여과막(filtering membrane)을 통해 여과하는 단계;

(h) 직경 50-400nm의 구멍을 갖은 막을 통해 압출하는 단계; 및

(i) 트랩(trap)되지 않은 모든 활성 성분을 제거하는 단계.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 수상은 0.05%-0.9%(w/v)의 염화나트륨 수용액으로 구성되는 것을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 8.

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 사용된 상기 지질의 양은 수용액의 각 중량부에 대해서 0.01-0.4 중량부임을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 9.

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 사용된 상기 활성 성분의 양은 상기 지질의 각 중량부에 대해서 0.01-0.3 중량부임을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 10.

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 단계 (h)에 사용되는 압출 가스는 공기, 질소, 헬륨 및 아르곤으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 상기 압출 가스는 500-5500kPa의 압력을 가지고 있음을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 12.

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 단계 (h)는 20-75℃의 온도에서 시행되는 것을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 상기 온도는 40-65℃임을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 14.

제 6항 또는 제 7항에 있어서, 상기 단계 (h)는 적어도 2회 이상, 8회 이하로 반복되는 것을 특징으로 하는 수용성 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 15.

삭제

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.